Weitere Beiträge zur Frage der Identität von Reduktionsvermögen und C-Vitamingehalt verschiedener pflanzlicher Erzeugnisse.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.

vorgelegt von

Kurt Enßlin

aus Eßlingen a. N.

1935

Gatzer & Hahn, Graphische Werkstätten, Schramberg (Schwarzwald)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547419_0002

Einleitung.

In Arbeiten über das Reduktionsvermögen pflanzlicher Lebensmittel, die im Frankfurter Institut für Nahrungsmittelchemie unter Anwendung der Titrationsmethode von Tillmans (1) ausgeführt wurden, wurde eine weitgehende Uebereinstimmung des Reduk-duktionsvermögens mit dem C-Vitamin-Gehalt der untersuchten Lebensmittel festgestellt und in vielen Fällen auch die Identität bewiesen. Diese Identität war vor allem immer bei frischem Obst und Gemüse nachweisbar.

Beim Vergleich des bei den verschiedensten pflanzlichen Lebensmitteln ermittelten Reduktionsvermögens mit deren Gehalt an Vitamin C setzte Jackisch (2) die von ihm erhaltenen Titrationswerte für 10 g Material auch in Beziehung zu dem C-Vitamin-Gehalt, den v. Hahn (3) in Tierversuchen ermittelt hatte, und stellte sogenannte Vergleichszahlen auf. Diese Vergleichszahl gibt an, wieviel ccm einer 0,001 n Lösung von 2,6-Dichlorphenolindophenol eine Tagesdosis des an Meerschweinchen verfütterten Materials unter Zugrundelegung der von Jackisch (2) gefundenen Reduktionswerte zu entfärben vermochte. Man erhält diese Zahl auch, indem man den von Jackisch ermittelten Verbrauch an Farblösung mit 10 multipliziert und durch die von v. Hahn (3) eingeführten Meerschweinchen-Einheiten dividiert. Normaler Weise sollte diese Zahl ungefähr 6—7 betragen, das heißt, die Menge C-Vitamin, die 6—7 ccm 0,001 n 2,6-Dichlorphenolindophenol reduziert, genügt, um nach unseren Erfahrungen ein Meerschweinchen vor Skorbut zu schützen. Nun beträgt die Vergleichszahl manchmal viel mehr als 7, etwa beim Grünkohl, wo sie 12, in anderen Fällen ist sie merklich kleiner, so bei Zitronen, wo sie 3,7 beträgt. Bei der Berechnung und Auswertung dieser Vergleichszahlen wurde allerdings die heute unbedingt feststehende Tatsache außer Acht gelassen, daß der C-Vitamin-Gehalt und damit das Reduktionsvermögen desselben pflanzlichen Lebensmittels äußerst starken Schwankungen unterliegt. Daß noch darüber hinaus die verschiedenartige Verteilung des C-Vitamins in der Pflanze berücksichtigt werden muß, konnte im Laufe dieser Arbeit nachgewiesen werden. (Siehe Seite 23). Da nun in diesem Falle die Ermittlung des Reduktionsvermögens und die Tierversuche von verschiedenen Autoren an verschiedenen Orten und teilweise sicher

zu verschiedenen Jahreszeiten vorgenommen wurden, so konnte sich ein Teil der Abweichungen der Vergleichszahlen nach unten oder oben durch diese eben besprochene Ursache erklären lassen. Weiterhin ist es unmöglich, allein mittels des Tierversuches ohne Zuhilfenahme einer chemischen Bestimmungsmethode den Vitamin-C-Gehalt des Untersuchungsmateriales mit derselben Schärfe bestimmen, wie dies mit der Titrationsmethode der Fall ist.

Eine der Aufgaben dieser Arbeit war nun, am Beispiel des Grünkohls die quantitativen Beziehungen zwischen Reduktionsvermögen und antiskorbutischer Wirkung aufzuklären. Die Wahl fiel deshalb auf den Grünkohl, weil einmal die Vergleichszahl fast das Doppelte des Normalwertes beträgt, nämlich 12 statt 6—7, zum andern, weil schon Jackisch (2) Zweifel an der völligen Identität von Reduktionsvermögen und antiskorbutischer Wirksamkeit äußerte.

Im weiteren Verlauf beschäftigt sich die Arbeit noch mit der Aufklärung des Reduktionsvermögens von schwefelsauren Kochauszügen der alkaloidhaltigen Genußmittel Tee, Kaffee und Kakao sowie des Heues.

I. Allgemeines über die Arbeitsweise.

I. Herstellung der Auszüge.

Das Untersuchungsmaterial muß im Allgemeinen zerkleinert werden. Hierbei ist darauf zu achten, daß bei Verwendung von Metallgeräten nur Messer oder sonstige Zerkleinerungsgeräte aus nicht rostendem Stahl benutzt werden, da das andernfalls in Lösung gehende Eisen bei der Titration störend wirkt. Ebenso muß jede Verunreinigung mit Kupfer vermieden werden.

Eine bestimmte Menge des Untersuchungsmaterials, je nach dem Gehalt an reduzierendem Stoff 1—20 g, wird dann mit 90 ccm 0,2%iger Essigsäure am Rückflußkühler unter Durchleiten von Stickstoff 10 Minuten im Kochen erhalten. Danach wird der Kolbeninhalt rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt, an der Luft durch ein Seihtuch gefiltert und gut abgepreßt. Mit 0,2%iger Essigsäure füllt man auf 100 ccm auf. Zur Kontrolle wird aus dem extrahierten Material noch ein zweiter Auszug in gleicher Weise hergestellt. Zur weiteren Klärung des Extraktes kann man, falls nötig, durch ein Faltenfilter filtrieren, wobei natürlich jede überflüssige Berührung der Lösung mit Luft vermieden werden muß.

2. Bereitung und Einstellung der Farblösung.

Die Menge des zur Bereitung von 1 l Farblösung notwendigen 2,6 Dichlorphenolindophenols schwankt je nach dem Reinheitsgrad erheblich. Von dem für diese Arbeit verwandten Farbstoff waren 0,16 g je Liter notwendig.

Die abgewogene Farbstoffmenge wird in 100 ccm warmem Wasser aufgeschwemmt. Sie löst sich nach kurzer Zeit bis auf einige Verunreinigungen auf. Nun wird durch ein Faltenfilter in einen 1 l Meßkolben filtriert und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. So hergestellte Farblösung ist im Eisschrank 4 Wochen gut haltbar. Trotzdem empfiehlt es sich, für besonders genaue Titrationen den nach der Herstellung festgestellten Faktor gelegentlich nachzuprüfen.

Zur Einstellung bereitet man sich eine genaue 0,01 n Lösung von Mohr'schem Salz (pro analysi) durch Einwiegen von 3,9215 g je Liter Lösung. Beim Auffüllen gibt man ungefähr 40 ccm n/2 Schwefelsäure hinzu, um die Lösung haltbarer zu machen. Im Dunkeln unter Stickstoff aufbewahrt hält sie sich sehr lange.

Die Einstellung geschieht in folgender Weise: Zu 10 ccm Farblösung werden 5 ccm gesättigte Natriumoxalat-Lösung zugesetzt. Sodann wird die 0,01 n Ferrolösung in eine Mikrobürette gefüllt, und die Farblösung mit der Ferrolösung titriert. Der Umschlag von blau auf schwaches gelb ist sehr genau sichtbar. Der Faktor ist bei Verwendung von genau 0,01 n Lösung von Mohr'schem Salz und 10 ccm der Farblösung gleich den verbrauchten Kubikzentimetern Ferrolösung.

3. Ausführung der Titration.

Bei ungefärbten oder nur schwach gefärbten Auszügen kommt die gewöhnliche Methode, bei stärker gefärbten die Nitrobenzolmethode in Anwendung. — Bei der Umrechnung auf Ascorbinsäure ist zu berücksichtigen, daß deren Reduktionsäquivalent gleich 88 ist. Ein Kubikzentimeter 0,001 n Farblösung entspricht also 0,088 mg Ascorbinsäure.

a) Gewöhnliche Methode.

10 ccm des essigsauren Auszuges werden mit 3 Tropfen gesättigter Natriumacetatlösung versetzt, sodaß etwa das p_H5 erreicht wird, und mit der Farblösung auf blauen Umschlag titriert. Eine leicht graublaue Färbung zeigt das Ende der Titration an. Gleichzeitig werden nochmals 10 ccm des Auszuges mit einigen

Tropfen Eisessig angesäuert, sodaß etwa p_H 2,5 erreicht wird, und dann mit der rot einfallenden Farblösung auf roten Umschlag titriert.

Schlechte Uebereinstimmung der Titrationswerte im roten und im blauen Gebiet des Farbstoffes deutet darauf hin, daß entweder neben dem Vitamin C noch andere reduzierende Körper vorliegen oder daß überhaupt kein Vitamin C vorliegt. Im ersteren Fall ist der im roten Gebiet erhaltene Titrationswert der genauere. Bei ziehenden Titrationen, die sich besonders beim Titrieren im blauen Gebiet bemerkbar machen, bei denen eine austitrierte Lösung sich langsam wieder entfärbt, ist der Endpunkt dann anzunehmen, wenn der Farbton innerhalb 1/4 bis 1/2 Minute nicht verschwindet.

b) Nitrobenzolmethode.

Bei stark gefärbten Auszügen ist die gewöhnliche Titration nicht anwendbar. Siebert (4) hat diesem Uebelstand dadurch abgeholfen, daß er den überschüssigen Farbstoff mit Nitrobenzol ausschüttelte. Die genaue Ausführung gestaltet sich folgendermaßen:

Man ermittelt nach Möglichkeit durch direkte Titration den ungefähren Titrationswert der Lösung. Sodann werden gleiche Mengen des Auszuges (ca. 10—20 ccm) in Zentrifugenröhren von 1,5 cm lichter Weite eingefüllt und mit einigen Tropfen Eisessig stark essigsauer gemacht. Nun läßt man von Glas zu Glas steigende Mengen der Farblösung zufließen und mischt sofort durch Rühren oder Umschwenken. Die Wartezeit, die man nun zwischen der Zugabe der Farblösung und der Zugabe des Nitrobenzols verstreichen läßt, ist insbesondere bei „ziehend" titrierenden Auszügen bei jedem Glas genau einzuhalten. Man wartet also entweder 1/2 oder 1 Minute, gibt 3 ccm gereinigtes Nitrobenzol dazu, schüttelt mehrfach vorsichtig aber doch ausgiebig durch, wobei eine Emulsionsbildung möglichst vermieden werden soll, und läßt absitzen. Sollte sich das Nitrobenzol nicht zusammensetzen, so genügt kurzes Schleudern in der Zentrifuge, um Trennung in zwei Schichten zu erreichen. Die Röhre, in der das Nitrobenzol gerade noch gelb, also noch nicht rötlich gefärbt ist, zeigt den Endpunkt der Titration an. Dieser läßt sich mit sehr großer Genauigkeit feststellen.

Oft kann der Titrationsendpunkt bei sehr stark gefärbten Auszügen dadurch leichter erkannt werden, daß man die über dem Nitrobenzol stehende Flüssigkeit abgießt und mit Wasser nochmals umschüttelt.

II. Aufklärung des Reduktionsvermögens von Grünkohl.

1. a) Bestimmung der antiskorbutischen Wirksamkeit im Tierversuch.

Wie schon in der Einleitung erwähnt (siehe Seite 2) ist die von Jackisch (2) errechnete Vergleichszahl für Grünkohl sehr hoch, nämlich 12. Ebenfalls in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß diese hohe Vergleichszahl bei Grünkohl einmal ihre Ursache in den starken Schwankungen des C-Vitamin-Gehaltes in den pflanzlichen Lebensmitteln haben kann; (s. S. 2) zum andern kann sie aber auch in der Ungenauigkeit des Tierversuchs ohne titrimetrische oder andere quantitative Bestimmung des C-Vitamin-Gehaltes begründet sein. Weitere Erklärungsmöglichkeiten wären, daß bei der Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol noch andere reduzierende Körper einen höheren C-Vitamin-Gehalt vortäuschen, oder daß von den Versuchstieren nicht alles C-Vitamin während des Verdauungsvorganges aus den Pflanzenzellen herausgelöst werden konnte und dann unausgenutzt den Verdauungstrakt verließ. Sollte sich die letzte Annahme bestätigen, dann wäre durch die Titration des schwefelsauren Auszuges der bessere Wert ermittelt worden. Aus diesem Grunde wurde der frische Grünkohl in zwei Versuchsreihen verfüttert und mit zwei Versuchsreihen verglichen, bei denen den Meerschweinchen der Extrakt gegeben wurde. Diese Versuchsreihen, selbstverständlich aufgebaut auf der Farbstofftitration, mußten auch die anderen bezüglich des Vitamin-C-Gehaltes des Grünkohls bestehenden Unsicherheiten beseitigen.

Gleichzeitig mit diesem Tierversuch sollten auch noch die Beziehungen zwischen antiskorbutischer Wirksamkeit und Reduktionsvermögen beim Zitronen- und Orangensaft genauer geklärt werden. Die Ursache hierzu war die Vergleichszahl von 3,7 bzw. 4,0 für Zitronen- bzw. Orangensaft. Die Richtigkeit dieser Zahlen hätte bedeutet, daß die Menge Zitronen- bzw. Orangensaft, die 3,7 bzw. 4,0 ccm 0,001 n Farblösung entspricht, bei täglicher Verabreichung an Meerschweinchen diese vor Skorbut zu schützen vermag. In allen Tierversuchen, die im Frankfurter Institut ausgeführt worden sind, hatten die positiven Kontrolltiere 1 ccm Zitronensaft, der neutralisiert worden war, oder 1 ccm Orangensaft erhalten. Das Reduktionsvermögen hält sich, wie immer wieder festgestellt wurde, bei den hier in Frankfurt erhältlichen Früchten für 1 ccm Zitronensaft zwischen 7,0 bis 7,5 und für 1 ccm Orangensaft zwischen 7,0 bis 8,0 ccm 0,001 n Farblösung. Jedoch kommen auch Schwan-

kungen vor und es ist leicht denkbar, daß die an anderen Orten im Handel befindlichen Früchte durchschnittlich einen höheren Gehalt an Reduktionsvermögen und damit an C-Vitamin besitzen. Auch zur Aufklärung dieser Fragen wurden zwei Versuchsreihen angesetzt. Diese Versuche wurden mit Orangensaft ausgeführt.

Die Anordnung des Tierversuchs ergibt sich aus nachstehender Aufzählung:

Reihe I. 2 Tiere, die negativen Kontrolltiere, die nur die Grundkost erhielten.

Reihe II. 3 Tiere, die neben der Grundkost täglich soviel Orangensaft bekamen, wie einem Titrationswert von 7 ccm Farblösung entsprach.

Reihe III. 3 Tiere, die neben der Grundkost täglich soviel Orangensaft bekamen, wie einem Titrationswert von 3,5 ccm Farblösung entsprach.

Reihe IV. 3 Tiere, die neben der Grundkost täglich soviel schwach essigsauren Grünkohlauszug erhielten, wie einem Titrationswert von 7 ccm Farblösung entsprach.

Reihe V. 3 Tiere, die neben der Grundkost täglich soviel schwach essigsauren Grünkohlauszug erhielten, wie einem Titrationswert von 3,5 ccm Farblösung entsprach.

Reihe VI. 3 Tiere, die neben der Grundkost täglich soviel frischen Grünkohl erhielten, wie einem Titrationswert von 7 ccm Farblösung entsprach.

Reihe VII. 3 Tiere, die neben der Grundkost täglich soviel frischen Grünkohl erhielten, wie einem Titrationswert von 3,5 ccm Farblösung entsprach.

Die Versuchsreihen III, V und VII wurden angesetzt, um die Frage nach der kleinsten Schutzdosis von Orangensaft, Grünkohlauszug und frischem Grünkohl zu beantworten. War die Annahme richtig, daß außer C-Vitamin noch andere reduzierende Stoffe bei der Titration des Grünkohls mit erfaßt wurden, so mußten die Tiere der Reihen IV—VII an Meerschweinchenskorbut sterben. Sollte sich dagegen die zweite Hypothese von der schlechteren Ausnutzbarkeit des in den Pflanzenzellen eingeschlossenen C-Vitamins bewahrheiten, dann mußten die Tiere der Reihen VI und

VII an Skorbut eingehen, während die Tiere der Reihe IV und vielleicht auch die der Reihe V normales Wachstum zeigen mußten.

Schon bei Voruntersuchung über den Titrationswert von Grünkohl wurde eine Fehlerquelle offenbar, die die Ergebnisse von v. Hahn beeinflußt haben mußte. Titriert man nämlich Grünkohlblätter der gleichen Größe, jedoch von verschiedenen Stauden, die auf dem selben Grundstück standen, so erhält man schon Werte, die zwischen 180 und 235 schwanken. Titriert man vollends Blätter der selben Staude, die verschiedene Entfernung vom Vegetationspunkt haben, so stellen sich, wie später noch genauer beschrieben werden wird, äußerst stark unterschiedene Titrationswerte heraus. Da v. Hahn (3) seine Tierversuche zur gleichen Jahreszeit ausführte wie wir, fällt der weitere Unsicherheitsfaktor der jahreszeitlichen Schwankungen weg.

Zur Verfütterung gelangte deshalb gut zerkleinertes und durchmischtes Material, möglichst immer aus der gleichen Blattzone. Der Reduktionswert der gemischten Probe wurde jedesmal kurz vor der Fütterung genau ermittelt.

Bei der Gewinnung des Orangensaftes unterlief noch eine interessante Beobachtung. Frischer Orangensaft titrierte einen Tag nach der Pressung mehr als am Tage vorher.

Titrationswert	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag
des Orangensaftes	6,75	7,59	6,93	6,74	6,55

Diese eigenartige Vermehrung des Reduktionsvermögens wurde jedoch nicht näher untersucht.

Da sich im Laufe des Tierversuches herausstellte, daß die Tiere, die den Kohlauszug erhielten (Reihe IV und V) schlechter gediehen, als die Tiere mit frischem Grünkohl (Reihe VI und VII), so wurde nachgeprüft, ob in den Kohlauszügen vielleicht reduzierende Körper mit SH-Gruppen vorhanden waren. Die angestellte Nitroprussidreaktion nach Hopkins fiel jedoch bei neutralem Kohlsaft negativ aus. Auch die Bleireaktion — der Kohlsaft wurde mit 10%iger Na_2CO_3-Lösung und $PbNO_3$ zwei Stunden gekocht und dann der entstandene Niederschlag in Essigsäure gelöst — führte zu keinem positiven Ergebnis. Nun bestand noch die Möglichkeit, daß der Kohlauszug eine Giftwirkung besaß. Um diese Frage zu klären, wurde eine neue, die 8. Versuchsreihe mit 3 Tieren angesetzt, die als Zulage soviel Kohlauszug zu fressen bekamen, wie dem Titrationswert von 14 ccm Farblösung entsprach. Die Versuchsdauer betrug bei dieser Reihe 29 Tage.

a_1) Verlauf des Tierversuches.

Abgesehen von der Zeit der Eingewöhnung dauerte der Haupttierversuch 62 Tage. Es wurden Meerschweinchen von 250 bis 300 g Gewicht verwendet.

Die Tiere der Reihe I zeigten die üblichen Wachstumskurven der negativen Kontrollen. Bis zum 5. bzw. 6. Tage nahmen sie zu, von da ab verloren sie sehr rasch an Gewicht, wurden hinfällig und starben am 24. bzw. 25. Tage des Versuches.

Die Tiere der zweiten Reihe nahmen rasch und stetig zu. Die Gewichtskurve verlief steil nach oben, wenn man die täglichen Schwankungen unberücksichtigt läßt, die bei jedem Tier eine Zickzack-Kurve verursachen.

Von den Tieren der dritten Reihe nahm das erste langsam zu, das zweite behielt sein nach kurzer Zeit erreichtes Höchstgewicht bei und das dritte zeigte nach kurzer Zunahme eine geringe Abnahme gegenüber dem Anfangsgewicht.

Die Tiere der vierten Reihe nahmen erst rasch zu, dann ging die Gewichtskurve waagerecht oder wenig ansteigend, um schließlich in dauernder, langsamer Aufwärtsbewegung zu verharren.

Die Tiere der fünften Reihe bieten das Bild einer Fütterungsreihe, bei der den Tieren zwar C-Vitamin zugeführt wurde, aber doch nicht genug, um sie am Leben zu erhalten. Sie nahmen erst rasch zu, um nach kurzer Zeit schon wieder langsam aber doch stetig an Gewicht zu verlieren. Ein Tier dieser Reihe mußte am 46. Versuchstage wegen völliger Hinfälligkeit getötet werden.

Alle Tiere der sechsten Reihe wuchsen normal. Sie zeigten die gleichen Wachstumskurven wie die positiven Kontrolltiere.

Bei der siebten Reihe ergab sich folgendes Bild:

Tier 18 nahm rasch zu, verlor dann soviel an Gewicht, daß es leichter wurde als bei Versuchsbeginn und behielt sein Gewicht dann bei. Tier 19 nahm ebenfalls im Anfang zu und verlor dann stetig an Gewicht, sodaß es bei Abbruch des Versuches sein Anfangsgewicht erreichte. Tier 20 endlich zeigte bis zum 15. Tage eine Zunahme und behielt dann sein Gewicht bis zum Schluß bei.

Die später angesetzte 8. Versuchsreihe verhielt sich genau so wie die positive Kontrollreihe, sodaß am 29. Tage diese Versuchsserie mit abgebrochen wurde.

In der folgenden Tabelle sind die Versuchsergebnisse kurz zusammengefaßt.

Reihe	Tier	Versuchs-dauer Tage	Gewichts-schwankung	Sektionsbefund	Histologischer Befund
I	1	25	Abnahme	Skorbut	Skorbut
	2	24	Abnahme	Skorbut	Skorbut
II	3	62	norm. Zunahme	—	—
	4	62	norm. Zunahme	—	—
	5	62	norm. Zunahme	normal	normal
III	6	62	keine Zunahme	l. Skorbut	leicht. Skorb.
	7	62	geringe Zun.	l. Skorbut?	leicht. Skorb.
	8	62	geringe Abn.	l. Skorbut?	leicht. Skorb.
IV	9	62	geringe Zun.	kein Skorb.	kein Skorbut
	10	62	geringe Zun.	l. Skorbut?	kein Skorbut
	11	62	geringe Zun.	kein Skorb.	kein Skorbut
V	12	46	Abnahme	Skorbut	Skorbut
	13	62	keine Abnahme	l. Skorbut	Skorbut
	14	62	geringe Abn.	Skorbut	Skorbut
VI	15	62	norm. Zunahme	normal	normal
	16	62	norm. Zunahme	—	—
	17	62	norm. Zunahme	normal	normal
VII	18	62	geringe Abn.	l. Skorbut	l. Skorbut
	19	62	keine Zunahme	l. Skorbut	l. Skorbut
	20	62	geringe Zun.	annäh. norm.	kein Skorbut
VIII	21	29	norm. Zunahme	—	—
	22	29	norm. Zunahme	—	—
	23	29	norm. Zunahme	normal	normal

Aus diesen Daten ist zu schließen, daß im Grünkohl soviel C-Vitamin oder nur unwesentlich weniger vorhanden ist, als dem Titrationswert bei p_H 2,5 entspricht. Wenn bei dem Tierversuch v. Hahn's eine höhere Schutzdosis bei Grünkohl aufgefunden wurde, so liegt das einmal an den starken Schwankungen des C-Vitamin-Gehaltes der Kohlblätter, sogar in der selben Pflanze (s. S. 23), zum Andern an der Unmöglichkeit, ohne Farbstofftitration allein mit Hilfe des Tierversuchs einen exakten Wert für den C-Vitamin-Gehalt eines Nahrungsmittels zu erhalten.

a_2) Experimenteller Teil.

Herstellung der Grünkohlauszüge.

Etwa 50 g mit Nirosta-Wiegemesser zerkleinerter, frischer Grünkohl wurde mit 90 ccm 2%iger Schwefelsäure im Stickstoff-

strom 10 Minuten im Kochen erhalten; dann wurde schnell abgekühlt und durch ein Seihtuch gefiltert. Das Filtrat wurde im Zentrifugenglas mit $CaCO_3$ neutralisiert, und der Niederschlag abgeschleudert. Die klare Lösung wurde mit wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure schwach angesäuert, worauf das Titrationsvermögen bei p_H 5 festgestellt wurde. Der Titrationswert im sauren Gebiet bei p_H 2,5, der, wie schon auf Seite 3 erwähnt, für das C-Vitamin typischer ist, lag etwa 10% niedriger. Der direkte Auszug mit verdünnter Essigsäure kam erst später allgemein in Anwendung.

Der verfütterte Orangensaft wurde auf der Handpresse ausgepreßt und durch Zentrifugieren von den hauptsächlichen Schwebestoffen befreit. Nach Titration mit Farblösung wurden die der Versuchsanordnung entsprechenden Mengen verfüttert.

Feststellung des Titrationswertes von frischem Gemüse.

Etwa 15 g mittelgroße Grünkohlblätter wurden gut zerkleinert und durchgemischt. 10 g davon wurden wie üblich mit 2%iger Schwefelsäure extrahiert und titriert. Der Rückstand wurde nochmals in der selben Weise ausgezogen. Da die zwei folgenden Auszüge zusammen konstant 12% des ersten ausmachten, unterblieben sie später, wurden jedoch in Rechnung gesetzt. Entsprechend dem Titrationswert wurden von dem restlichen Grünkohlgemisch von Tag zu Tag wechselnde Mengen verfüttert, die bei den Tieren der Reihe VI zwischen 0,25—0,45 g lagen.

Fütterungsweise und Grundkost.

Nach der täglichen Gewichtskontrolle wurden die Meerschweinchen gefüttert. Sie erhielten erst eine Hand voll Hafer — die schon krank aussehenden Tiere wurden an Stelle dessen mit Haferflocken gefüttert — dann wurde das entsprechende C-Vitamin-Präparat in 5 ccm Milch gereicht. Die negativen Kontrollen erhielten nur die Milch. Innerhalb einer halben Stunde hatten die Tiere das Präparat fast immer schon freiwillig zu sich genommen. Die verfütterte Milch wurde nach folgender Vorschrift bereitet:

125 g Trockenmilch wurden in heißem Wasser zu einem Liter gelöst. In 50 ccm dieser Milch wurde der Säuregrad nach Soxhlet-Henkel ermittelt. Dann wurde entsprechend mit n/4 NaOH die Hauptmenge ohne Zusatz von Phenolphtalëin neutralisiert. Sofort anschließend wurde bis zum Erkalten Luft durchgesaugt. Sodann wurde unter Umschwenken mit n/4 HCl bis zu dem Säure-

grad 5 angesäuert. Zum Schluß wurde die Milch noch mit 10 g Scott's Emulsion (Lebertran) innig vermischt.

Sobald das Präparat vollkommen aufgenommen war, wurde den Tieren eine große Hand voll Heu und eine größere Menge der präparierten Milch verabreicht. Das verfütterte Heu wurde, um alles C-Vitamin sicher zu zerstören, zwei Stunden im Autoklaven erhitzt. Die Milchmenge schwankte je nach der Größe der Tiere zwischen 30 und 70 ccm.

b) Bestimmung der antiskorbutischen Wirksamkeit mit chemischen Methoden.

Wie schon im vorigen Abschnitt (s. S. 9) erwähnt wurde, stimmen die Titrationswerte von Grünkohlauszügen im roten und blauen Gebiet des Farbstoffes nicht völlig überein. Durchschnittlich sind die Werte im sauren, d. h. roten Gebiet um 10% niedriger als die in neutraler Lösung erhaltenen. Da bekannt ist, daß Ascorbinsäure im sauren und neutralen Gebiete genau die selben Werte ergibt, so ließ diese Differenz darauf schließen, daß im Grünkohlauszug neben Vitamin-C noch andere reduzierende Körper anwesend waren. Es sollte nun versucht werden, sie einmal der Menge nach, nach Möglichkeit aber auch ihrer Art nach zu erfassen.

In Frage kommen als störende Körper in solchen Gemüseauszügen, soweit wir heute wissen, zweiwertiges Eisen, polyphenolartige Gerbstoffderivate und Kohlehydratspaltprodukte, sowie reduzierende SH-Verbindungen.

Eisenbestimmung in Gemüseextrakten hat schon Jackisch (2) durchgeführt und gezeigt, daß die vorkommenden geringen Mengen nicht in der Lage sind, das Titrationsergebnis merklich zu beeinflussen.

Zur Erkennung anderer störender Stoffe, in der Hauptsache allerdings der gerbstoffartigen Körper, hat vor allem Beier (6) im hiesigen Institut Untersuchungsmethoden ausgearbeitet und zusammengestellt, die Schlüsse auf die Menge und auch auf die Art der neben dem C-Vitamin vorhandenen störenden reduzierenden Stoffe zulassen.

So können vor allem durch Titration mit einer 0,001 n Lösung des Prune-Farbstoffes infolge dessen spezifischeren Red. Ox.-Potentials manche Stoffe, insbesondere gerbstoffartige vom Tannin-Typ, ausgeschaltet werden, die zwar 2,6 Dichlorphenolindophenol, nicht aber Prune entfärben. Die Untersuchungen an essig- und schwefelsauren Kohlextrakten ergaben sowohl bei der heißen, als

auch bei der kalten Prunetitration genau die selben Werte wie bei Anwendung unseres Farbstoffes. Die gute Uebereinstimmung dieser Titrationsarten läßt mit großer Sicherheit auf C-Vitamin schließen.

Eine weitere qualitative Probe auf Gerbstoffe, die Färbung mit Ferrichlorid, fiel wenig spezifisch aus. Die entstandene schwach gelbgrüne Farbe ließ jede Möglichkeit offen.

Bei der sauren Bleifällung bleiben etwa 88% des Reduktionsvermögens in Lösung, während 12% ausgefällt werden. Da das C-Vitamin aber durch voluminöse Fällungen leicht mitniedergerissen wird, so hat dieser Verlust von 12% wenig Bedeutung. Man kann allenfalls sagen, daß mindestens 88% als C-Vitamin angesehen werden müssen.

Zur weiteren Aufklärung über die Komponenten des Reduktionsvermögens von Grünkohlauszügen wurde auch noch die von Beier (6) eingeführte „Hydrolysezahl" bestimmt. Es handelt sich hierbei darum, festzustellen, ob und wie stark das Reduktionsvermögen eines essigsauren Kochauszuges beim Kochen mit 1% HCl erhöht wird. Eine Erhöhung des Reduktionsvermögens beim Kochen mit HCl deutet nach den bisherigen Erfahrungen auf Spaltung von gerbstoffartigen Körpern und von Kohlehydraten und deren Derivaten zu reduzierenden Stoffen hin. Bei Grünkohlauszügen fand eine solche Hydrolyse nicht statt, das Reduktionsvermögen des Extraktes vor der Kochung mit HCl verhielt sich zu dem Reduktionsvermögen danach wie 1:1. Die Hydrolysezahl ist also gleich 1.

Daß SH-Verbindungen ein höheres Reduktionsvermögen nicht verursachen konnten, wurde auf Seite 7 dargetan.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß, wie auch der Tierversuch ermittelte, neben dem C-Vitamin reduzierende Stoffe nur in so minimaler Menge vorhanden sein können, daß sie praktisch nicht in Frage kommen. Titriert man also essigsaure Kohlextrakte bei p_H 2,5 mit dem Farbstoff, so erfaßt man sicher ausschließlich C-Vitamin.

III. Aufklärung des Reduktionsvermögens von Auszügen aus Tee, Kaffee und Kakao.

Bei der Titration von vielen Drogen und Genußmitteln stellte Nink (7) fest, daß schwefelsaure Extrakte der alkaloidhaltigen Genußmittel ebenfalls auf die Farblösung ansprechen. Diese reduzierenden Stoffe sollten hier näher untersucht werden.

1. Das Reduktionsvermögen von Teeauszügen.

Nink (7) hat auf 10 g Tee berechnet in schwefelsauren Auszügen ein Reduktionsvermögen von 360 ccm 0,001 n Farblösung festgestellt. Es wurden nun zuerst verschiedene Teesorten auf ihren Reduktionswert geprüft und festgestellt, daß grüner Tee mehr als schwarzer, und bei den schwarzen Tees wiederum die schlechten Sorten meist sehr titrierten, als die guten. Hier seien einige Versuchsergebnisse wiedergegeben.

			T.W.
Chun Mee	(China)	grüner Tee	438,0
Flowery Pekoe	(China)	Teeblüten	365,0
Congo	(China)	schwarzer Tee	170,0
Souchong	(China)	schwarzer Tee	121,5
Sumatra Pekoe	(Nied.Ind.)	schwarzer Tee	267,4
Formosa Flowery-Orange Pekoe	(Japan)	schwarzer Tee	194,0
Nyassa Orange Pekoe	(Brit. Ost-Afrika)	schwarzer Tee	292,4

Alle diese Titrationswerte wurde im 1%ig schwefelsauren Auszug erhalten und sind auf 10 g Tee berechnet. Zur Bestimmung des Reduktionsvermögens wurde die Nitrobenzoltitration ausgeführt.

Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen bildete schwarzer Tee das Ausgangsmaterial. Es wurde versucht, die Ursache seines hohen Reduktionsvermögens aufzuklären. Handelte es sich hierbei um C-Vitamin, so war damit zu rechnen, daß das Reduktionsvermögen beim Erhitzen in alkalischer Lösung und gleichzeitigem Luftdurchleiten erheblich vermindert wurde. Versuche, die in dieser Richtung ausgeführt wurden, zeigten, daß selbst bei mehrstündigem Erhitzen im Luftstrom der Teeextrakt sein Reduktionsvermögen nicht nur beibehielt, sondern sogar in vielen Fällen noch erhöhte. Dadurch gewann die Annahme, daß Gerbstoffe, die ja im Tee in größeren Mengen vorhanden sind, das Reduktionsvermögen verursachen, an Wahrscheinlichkeit. Auch stand die Tatsache, daß grüner Tee höhere Werte ergibt als schwarzer Tee, mit dieser Deutung im Einklang. Durch die Fermentation, der schwarzer Tee unterworfen wird, wird ja die Gerbstoffmenge verringert.

Um die Beziehungen zwischen Teegerbstoff und Reduktionsvermögen zu klären, wurden Fällungen mit einigen Gerbstoff-Fällungsmitteln durchgeführt und das Verhalten des reduzierenden Stoffes bei diesen Fällungen verfolgt.

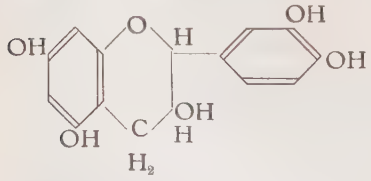
Eiweißfällung. Mit Eiweißlösung wurden zahlreiche Versuche angestellt, die jedoch nur unbefriedigende Ergebnisse lieferten. Es gelang nicht, die Fällung so zu gestalten, daß die Ferrichlorid-Reaktion im Filtrat der Fällung negativ wurde und der Titrationswert auf 0 reduziert wurde. Im günstigsten Falle sank das Reduktionsvermögen auf 20% des Ausgangswertes, doch konnten diese 20% weder durch weiteren Zusatz des Fällungsmittels, noch durch Aenderungen der Konzentration und der Wasserstoffstufe zur Ausscheidung gebracht werden.

Bleifällung. Da Gerbstoffe oft mit Bleiazetat in schwach saurer Lösung ausfallen, so wurde auch diese Methode auf Teeauszüge angewandt. Ein bestimmtes Volumen des essigsauren Teeauszuges wurde mit Farblösung titriert. Dann wurden gleiche Volumina des Auszuges mit steigenden Mengen Bleiazetatlösung behandelt und die entstehenden Niederschläge abzentrifugiert. Im klaren überstehenden Teil wurde nun wieder mit Farblösung das Reduktionsvermögen festgestellt. Es ergab sich, daß bei der Bleifällung mindestens 90% des Titrationswertes in die Fällung gingen. Handelte es sich beim Teeextrakt um C-Vitamin, so müßte sich der größte Teil des Reduktionsvermögens im Filtrat wiederfinden. Da jedoch nur noch 10% im Filtrat verblieben, so mußte auf die Abwesenheit von C-Vitamin geschlossen werden. Es gelang jedoch nicht, die Fällung so zu gestalten, daß sämtliches Reduktionsvermögen niedergeschlagen wurde.

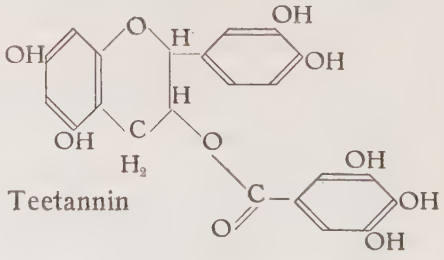
a) Versuch der Darstellung des Teegerbstoffes.

Ausgehend von dem Gedanken, daß der reduzierende Körper des Teeauszuges vielleicht mit den teilweise schon bekannten Teegerbstoffen identisch sein könne, wurde die Reindarstellung versucht.

Tsujimura (8) hat aus grünem Tee zwei Gerbstoffe isoliert, die er Tee-Tannin und Tee-Katechin nennt und denen er folgende Formeln zuschreibt:



Teekatechin



Teetannin

Da seinen Ausführungen zufolge die Hauptmenge des Teekatechins im Filtrat der sauren Bleifällung bleibt, so kam die Darstellung des Katechins nicht in Betracht, denn der reduzierende Körper ist, wie oben ausgeführt (s. S. 14), mit Blei fällbar. Da gegen wurde der Trennungsgang für die Darstellung von Teetannin genau durchgeführt und gleichzeitig während des Arbeitsganges jeweils der Titrationswert bestimmt, um das Verbleiben des Reduktionsvermögens bei den einzelnen Reinigungsoperationen zu verfolgen. Die Ausführung der Gerbstoffdarstellung sei im Folgenden beschrieben. Alle Reinigungsoperationen wurden unter Stickstoff ausgeführt.

Der Tee wurde fein gemahlen und mit Essigester, der 10% Wasser enthielt, 24 Stunden kalt extrahiert. Dann wurde abgepreßt und der Preßsaft in Vakuum bei 45° bis auf ein kleines Volumen eingedampft, sodaß aller Essigester entfernt war. Der Preßrückstand wurde nochmals in der selben Weise extrahiert und die Flüssigkeit eingeengt. Die vereinigten Lösungen wurden filtriert und mit Wasser und der für die Fällung nötigen Menge Bleiazetat versetzt. Nachdem der braune Niederschlag sich abgesetzt hatte, wurde die klare hellgelbe Lösung durch Dekantieren abgetrennt. Nur etwa 1% des Reduktionsvermögens blieb in Lösung. Der dicke Bleiniederschlag wurde nun mit Wasser gewaschen, und dann durch Zugabe von überschüssiger 10%iger Schwefelsäure das Blei ausgefällt. Nach kurzem Stehen ließ sich der grünbraune Niederschlag leicht abtrennen. In der Lösung waren jetzt noch 50% des Ausgangstitrationswertes vorhanden. Das rotgelbe Filtrat wurde neutralisiert und mit Essigester im Perforator ausgezogen. Der Aethylazetatauszug wurde im Vakuum eingedickt, und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Auch hierbei trat ein starker Verlust an Reduktionsvermögen auf. Die Lösung wurde nun im Perforator mit Aether ausgezogen und der ätherische Anteil abgetrennt. Nach Verdampfen des Aethers blieb ein Extrakt zurück, der diesmal erheblich weniger Farblösung verbrauchte, als der Essigesterextrakt. Bei der nun folgenden Behandlung mit Tierkohle fiel der Reduktionswert auf 0. Die Gerbstoffreaktion mit Ferrichlorid war dagegen noch stark positiv. Beim Erhitzen dieses gereinigten Materials trat parallel zu der wiederkehrenden Braunfärbung auch wieder $^1/_{20}$ des Reduktionswertes auf, den der Aetherextrakt vor der Behandlung mit Tierkohle aufwies. Leider mußte der Trennungsgang wegen der zu geringen Ausbeute hier abgebrochen werden.

Bei fast jeder Reinigungsoperation trat also ein starker Verlust an Reduktionsvermögen auf, ja dieses wurde durch die Kohle-

behandlung völlig vernichtet. Das Verschwinden und nach dem Erhitzen Wiederauftreten des Reduktionsvermögens ließ die Vermutung aufkommen, daß man es bei dem reduzierenden Stoff im Tee nicht mit dem von Tsujimura beschriebenen Teetannin, wohl aber mit Zersetzungs- vielleicht auch Hydrolyse-Produkten der Teegerbstoffe zu tun habe. Die oft zu beobachtende Parallelität zwischen Farbtiefe und Titrationswert der Extrakte war eine weitere Stütze dieser Vermutung. Hinzu kam noch, daß sich die Titrationsergebnisse der heißen, wässrigen und heißen sauren Auszüge ganz gut mit dieser Hypothese erklären ließen. Die schwefelsauren Auszüge wiesen durchweg viel höhere Titrationswerte auf als die Summe der heißen wässrigen Auszüge. Auch titrierten diejenigen Auszüge mehr, bei denen mehr Extraktionsflüssigkeit in Anwendung gekommen war.

b) Weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Reduktionsvermögens von Tee-Extrakten.

Der direkte Beweis dafür, daß beim Tee Hydrolyseprodukte das Reduktionsvermögen verursachen, wurde mit Hilfe des kalten wässrigen Auszuges erbracht. Dieser Auszug titrierte 12 ccm Farblösung für 10 g Tee. Nach halbständigem Kochen konnte eine Steigerung des Titrationswertes um über 500% auf 65 ccm Farblösung beobachtet werden.

Des weiteren wurden wieder einige der von Beier (6) zusammengestellten Methoden auf Tee-Extrakte angewandt. Hierzu fanden 0,2%ig essigsaure Kochauszüge Verwendung. Die aus den Resultaten der Einzel-Reaktionen zu ziehenden Schlüsse sind im Anschluß daran zusammenhängend ausgeführt.

Die Prune-Titration.

Titrationsmethode angewandt auf 5 ccm Extrakt	ccm Farblösung
2,6-Dichlorphenolindophenol	5,4
Prune kalt (umgerechnet)	5,3
Prune heiß	9,0

Hydrolysezahl.

Damit ist das Verhältnis der Reduktionswerte eines essigsauren Kochauszuges vor und nach einer Kochung mit 1% Salzsäure zahlenmäßig festgelegt. Bei Tee betrug sie 2,4.

Aussalzen mit NaCl.

Nach dem Aussalzen des Teeauszuges mit festem NaCl titrierte die überstehende Flüssigkeit noch 44% des Ausgangswertes.

Formalin-Salzsäurebehandlung.

10 ccm Teeauszug vom Titrationswert 5,0 wurden mit 1 ccm konzentrierter Salzsäure und 4 ccm 40%iger Formaldehyd-Lösung eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur unter Stickstoff sich selbst überlassen. Danach wurde zentrifugiert. Die klare Lösung titrierte noch 4,5 ccm Farblösung. Die Abnahme betrug also 10%.

Andererseits wurden 10 ccm Teeauszug vom Titrationswert 15,0 mit 1 ccm konzentrierter Salzsäure und 4 ccm Formalin unter Luftabschluß zum Sieden erhitzt.

Vor der Erhitzung	15,0 ccm Farblösung
Nach 10 Minuten	14,0 ccm
Nach 20 Minuten	12,0 ccm
Nach 30 Minuten	12,0 ccm

Die Titration verlief stark ziehend und war deshalb nicht einwandfrei zu gestalten.

Diese vier Methoden ergaben folgendes Bild: Die heiße Prune-Titration lieferte höhere Werte, als die kalte Titration mit dem selben Farbstoff. Es hatte also beim Erhitzen der salzsauren Lösung eine Hydrolyse eingesetzt. Welcher Art das schon vorhandene Reduktionsvermögen ist, konnte durch die Prune-Titration nicht erklärt werden. Auch die Hydrolysezahl läßt keine weiteteren Schlüsse zu. Mit NaCl ließ sich etwa die Hälfte des Reduktionsvermögens entfernen. Doch läßt auch diese Methode die Frage nach der Herkunft des Reduktionsvermögens ziemlich offen. Bei der kalten Formalin-Salzsäurebehandlung ging der Titrationswert nur um 10% zurück. Auf Katechine läßt sich der Reduktionswert also nicht zurückführen. Die heiße Behandlung mit Formalin-Salzsäure soll Aufschluß über die Anwesenheit von C-Vitamin geben. Zutreffenden Falles geht das Reduktionsvermögen dann bei der heißen Formalin-Salzsäurebehandlung vollständig zurück. In diesem Falle wäre also Vitamin C nicht vorhanden.

Bei Tee wurde mithin folgendes Resultat erzielt: Es wurde bewiesen, daß man es beim Reduktionswert des Tees nicht mit C-Vitamin zu tun hat. Weiterhin wurde gezeigt, daß der Titrationswert nicht auf den beiden bekannten Gerbstoffen des Tees beruht, daß vielmehr der größte Teil des Titrationswertes auf Hy-

drolyseprodukte zurückzuführen ist. Von den ca. 200 ccm Reduktionsvermögen sind 188 ccm als Hydrolyseprodukt aufzufassen, 12 ccm waren originär vorhanden und konnten nicht erklärt werden. Wahrscheinlich ist für dieses restliche Reduktionsvermögen eine Zersetzung etwa bei der Fermentation verantwortlich zu machen. Aus welchen Stoffen die Hydrolyseprodukte entstehen, konnte nicht ermittelt werden. Doch ist anzunehmen, daß es Körper von Gerbstoffcharakter sind, was ja der Reinigungsgang zu bestätigen scheint. — C-Vitamin ist im schwarzen Tee nicht vorhanden.

2. Das Reduktionsvermögen von Kaffeeauszügen.

Für gebrannten Kaffee wurde der Titrationswert 220 gefunden. Dieser reduzierende Stoff hat nichts mit dem C-Vitamin gemein. Dies geht daraus hervor, daß, wie auch Nink (7) feststellte, der Extrakt ungerösteten Kaffees mit der Farblösung nicht reagiert. Das ganze Reduktionsvermögen entstand beim Rösten und konnte also auch nicht durch Vitamin C verursacht sein. Ueber die Natur des Reduktionsvermögens konnten keine Zweifel mehr herrschen. Es tritt als Zersetzungserscheinung auf und hatte für diese Arbeit kein Interesse mehr.

3. Das Reduktionsvermögen von Kakaoauszügen.

Bei 0,2%ig essigsauren Auszügen von Kakao wurde ein Reduktionswert von 60 ccm Farblösung gefunden. Um nachzuprüfen, wie weit dieser Wert erst nachträglich durch die Verarbeitung der Kakaobohnen etwa durch Hydrolyse verursacht war, wurden auch die ungerösteten Kakaobohnen auf ihr Reduktionsvermögen gegen Farblösung untersucht.

	Titrationswert
Essigsaurer Auszug von 10 g geschälten Kakaobohnen	12
Essigsaurer Auszug von 10 g Kakaoschalen	28
Zweiter Auszug	10

Aehnliche Verhältniszahlen werden auch von Nink (7) beschrieben. Der nur gerotteten, ungerösteten Kakaobohne kommt also schon Reduktionskraft zu. Die höheren Werte des fertigen Kakaopulvers können bei dem üblichen Aufschließen des Kakaos mit alkalischen Beischlägen entstanden sein, wie ja auch beim Tee durch Erhitzen mit Alkali infolge Bildung des von v. Euler (9) beschriebenen Reduktons oder ähnlicher Stoffe hohe Titrationswerte erzielt werden können. Auf Kakao wurden nun die selben

Methoden angewandt, die beim Tee und teilweise beim Grünkohl schon besprochen wurden.

Zunächst wurden Kakaoauszüge hergestellt und diese Auszüge der Hydrolyse unterworfen.

	Titrationswert
Kalter wässriger Auszug	9
Auszug mit 1% HCl hydrolysiert	20
Heißer essigsaurer Auszug	40
Auszug mit 1% HCl hydrolysiert	94

In beiden Fällen beträgt die Hydrolysezahl 2,3. Interessant ist, daß sich die Extrakte zwar mit 1% HCl, jedoch nicht mit 1% H_2SO_4 hydrolysieren ließen. Es war mithin eine ziemlich hohe Wasserstoffionenkonzentration erforderlich, während bei Tee schon einfaches Kochen mit Wasser genügte.

Auch bei der Prunetitration machte sich die Hydrolyse bemerkbar.

	Titrationswert
2,6-Dichlorphenolindophenol	16
Prune kalt (umgerechnet)	12
Prune heiß	55

Mit Ferrichlorid färbte sich der Kakaoextrakt schmutzig-grün, schlug aber bei Zusatz von Natriumazetat nach blauschwarz um. Die Bleifällung zeitigte das selbe Ergebnis wie bei Tee. Es konnten 95% des Reduktionswertes aus der Lösung entfernt werden. Damit war der Beweis erbracht, daß im Kakao der größte Teil des Reduktionsvermögens nicht von Vitamin C herrührt. Es mußte also ein anderer reduzierender Körper im Kakao zugegen sein. Da dieser sich beim Kochen mit Formalin-Salzsäure aber ganz anders verhielt als der reduzierende Faktor des Tees, so konnten die beiden Stoffe auch nicht identisch sein. Kakaoauszug büßte nämlich hierbei einen großen Teil seines Titrationswertes rasch ein. Nach einer halben Stunde waren nur noch 37,5% des Ausgangswertes vorhanden.

Bei der Aussalzung mit Kochsalz fanden sich 70% des Titrationswertes in Lösung wieder.

Für Kakao gilt also im großen Ganzen das selbe wie für Tee. Das Reduktionsvermögen, was ca. 15 ccm übersteigt, rührt von nachträglicher Zersetzung her. Daß die 15 ccm Anfangstitrationswert nicht auf C-Vitamin beruhen, geht aus der Bleifällung klar hervor. Sollte C-Vitamin wirklich vorhanden sein, dann jedenfalls nur in so verschwindend kleinen Mengen, daß sie praktisch keine Bedeutung haben.

IV. Aufklärung des Titrationswertes von Heu.

Stammler (10) wandte die Titrationsmethode auch auf Heu an und fand in den 1%ig schwefelsauren Auszügen abnorm hohe Werte. Besonders auffallend waren die Ergebnisse des zweiten und dritten Auszuges. Das von ihm untersuchte Heu stammte aus Seefeld in Tirol. Für Frühjahrsheu gibt Stammler Titrationswert 202, für Sommerheu 655 und für Herbstheu 915 an. Der zweite Auszug betrug jeweils 80% des ersten, der dritte Auszug vollends reduzierte noch genau so stark wie der zweite Auszug. Die aufeinander folgenden wässrigen Kochauszüge bieten etwa das gleiche Bild, jedoch mit wesentlich niedrigeren Zahlenwerten. Der wässrige Extrakt von 10 g Heu entfärbte etwa 30 ccm Farblösung.

Zur Nachprüfung und Erklärung dieser Werte wurden zunächst schwefelsaure und essigsaure Kochauszüge von vier verschiedenen Heusorten der Frankfurter Umgebung hergestellt, deren Titrationswerte hier wiedergegeben seien.

	Heu I	Heu II	Heu III	Heu IV
1. H_2SO_4Auszug	65(70)	100	72	54
2. H_2SO_4Auszug	30(34)	40	—	—
1. Essigsäureauszug	10(12)	20	—	—
2. Essigsäureauszug	6(10)	6	—	—

Die Werte in Klammern sind bei p_H 5 ermittelt. Unter diesen Heusorten befand sich demnach keine, mit der auch nur annähernd so hohe Werte zu erhalten waren, wie das bei dem Heu von Seefeld möglich war. Es wurden deshalb Heusorten, die ebenfalls aus den Alpen und zwar aus Mittelberg in Voralberg stammten, der selben Behandlung unterworfen. Die Analysenergebnisse sind in der Tabelle angeordnet.

	Wiesenheu 1. Schnitt	Grummet	Bergheu 1. Schnitt
1. H_2SO_4Auszug	55	50	54
2. H_2SO_4Auszug	12	20	16
1. Essigsäureauszug	10	24	20
2. Essigsäureauszug	3	7	6

Mit diesem Alpenheu konnten also im schwefelsauren Auszug keine höheren Titrationswerte erreicht werden, als mit den hiesigen Heusorten. Beim Kochen mit Wasser wurden jedoch für den ersten Auszug gleich hohe Werte gefunden, wie Stammler sie für die wässrigen Kochauszüge seines Heus angibt.

Es fragte sich jetzt, ob die Steigerung des Titrationswertes bei den schwefelsauren Auszügen auf Hydrolyse beruhte, oder ob

sie auf eine gründlichere Auskochung zurückzuführen war. Entschieden wurde diese Frage durch nachstehenden Versuch. Es sei noch bemerkt, daß im folgenden stets das selbe Heu verwendet wurde.

Es wurde einmal ein schwefelsaurer Auszug von 10 g Heu hergestellt, zum Andern wurde ein analog hergestellter wässriger Heuauszug mit 1% Schwefelsäure 10 Minuten erhitzt. Der im letzten Falle ermittelte Titrationswert war fast gerade so hoch, wie der des schwefelsauren Auszuges.

	Titrationswert
Heißer schwefelsaurer Heuauszug	48
Heißer wässriger Heuauszug	20
Heißer wässriger Heuauszug mit 1% H_2SO_4 gekocht	46

Damit war bewiesen, daß die Differenz zwischen schwefelsaurem und heißem wässrigen Heuextrakt durch Hydrolyse verursacht war. Nun konnte ja immer noch der Titrationswert des heißen wässrigen Auszuges auf C-Vitamin beruhen. Jedoch weisen die verschiedenen Titrationswerte bei p_H 5 und p_H 2,5, also im blauen und im roten Gebiet des Farbstoffes, darauf hin, daß zum mindesten noch andere reduzierende Körper neben C-Vitamin in den wässrigen Kochauszügen anwesend waren. Folgender Versuch sollte Klarheit darüber schaffen.

100 g Heu wurden 1 Stunde im Autoklaven erhitzt und nach dem Trocknen der zehnte Teil mit 0,2%iger Essigsäure heiß ausgezogen. Der Auszug entfärbte 30 ccm Farblösung auf 10 g Heu berechnet, der schwefelsaure Auszug des selben Heus dagegen nur wenig mehr, nämlich 40 ccm Farblösung. Bei den Bedingungen der Erhitzung im Autoklaven scheint das Heu also hydrolysiert und gleichzeitig ein Teil des neu entstandenen Reduktionsvermögens wieder zerstört zu werden. Aus dem Versuch ersieht man außerdem mit einiger Wahrscheinlichkeit, daß das Reduktionsvermögen nicht von der Anwesenheit von C-Vitamin herrührt. Noch deutlicher wurde dies durch einen anderen Versuch erwiesen.

10 g fein gemahlenes Heu wurden im Eisschrank mit 100 ccm Wasser drei Tage lang unter Luftausschluß extrahiert. Die bräunliche Flüssigkeit reduzierte nur 1,2 ccm Farblösung. Nun wurde die Lösung 10 Minuten im Stickstoffstrom gekocht. Der Reduktionswert stieg auf 22 ccm Farblösung an. Wurden 10 g Heu nach der üblichen Arbeitsweise mit heißem Wasser ausgelaugt, so resultierte der Titrationswert 20. Dieses Versuchsergebnis ist nur dadurch zu deuten, daß man das Reduktionsvermögen des heißen wässrigen Auszuges auch schon auf Hydrolyse zurückführt.

Zur Bekräftigung dieses Ergebnisses wurde ein zweiter Versuch angestellt.

Ein kalter wässriger Heuauszug vom Titrationswert 0,3 für 10 g Ausgangsmaterial wurde 15 Minuten lang mit 1% Schwefelsäure gekocht. Das Reduktionsvermögen erhöhte sich auf 45. Nach 30 Minuten langem Kochen war es auf 54 angestiegen.

Parallel hierzu wurde ein heißer wässriger Heuauszug vom Titrationswert 20 für 10 g Ausgangsmaterial mit 1% Schwefelsäure 15 Minuten lang erhitzt. Auch hierbei erhöhte sich das Reduktionsvermögen und zwar auf 48. Nach 30 Minuten langem Erhitzen war es auf 52,5 angestiegen. Mithin war es gleichgültig gewesen, ob das Heu kalt oder heiß mit Wasser ausgelaugt wurde, bei der darauf folgenden Kochung mit Säure ergaben sich doch die gleichen Reduktionswerte. Damit ist für Heuauszüge mit Sicherheit klargestellt, daß das gesamte Reduktionsvermögen auf Hydrolyse beruht, die teilweise schon beim Kochen mit Wasser eintritt. Der Ausgangsstoff aus dem durch Kochen mit Wasser, Essigsäure oder Schwefelsäure in immer zunehmendem Maß der reduzierende Körper gebildet wird, ist, wie die Versuche ebenfalls ergaben, vollständig in kaltem Wasser löslich.

Welche Körper sind es nun, die sich hier schon mit heißem Wasser aufspalten lassen und so reduzierende Substanzen liefern?

Eine Andeutung ergab die Reaktion mit Ferrichlorid. In den heißen wässrigen Auszügen war der Titrationswert um so höher, je dunkler olivgrün die Färbung mit Eisenchlorid ausfiel. Das spräche für Stoffe, die bei der Hydrolyse Phenole erzeugen, also auch für Gerbstoffe und deren Derivate.

Versuche, mit Bleiazetat den hydrolysierbaren Körper auszufällen, schlugen fehl. Nach der Bleifällung konnte durch einfache Erhitzung des Filtrates eine sehr starke Erhöhung des Reduktionsvermögens hervorgerufen werden. Der Titrationswert stieg hierbei von 1,2 ccm Farblösung auf 180 ccm Farblösung an. Die Gerbstoffreaktion fiel negativ aus. Bei der Bildung dieses im Filtrat der Bleifällung durch Kochen erhaltenen Reduktionsvermögens hat man es wohl mit einem komplizierteren Vorgang zu tun als bei der normalen Hydrolyse der Heuauszüge. — Eine Stütze dieses Befundes bei Heu lieferten die Werte der Prunetitration. Die Ausgangslösungen waren jeweils kaltgewonnene wässrige Auszüge vom Titrationswert 0,3 ccm Farblösung.

Heuauszug, unter Stickstoff 10 Minuten gekocht, titrierte:

26 ccm 0,001 n 2,6-Dichlorphenolindophenol
0 ccm 0,001 n Prune kalt
57 ccm 0,001 n Prune heiß

Heuauszug unter Stickstoff mit 1% H_2SO_4 10 Minuten gekocht, titrierte:

110 ccm 0,001 n 2,6-Dichlorphenolindophenol
0 ccm 0,001 n Prune kalt
68 ccm 0,001 n Prune heiß

Heuauszug mit Bleiazetat gefällt, zentrifugiert und dann ohne Zusatz hydrolysiert, titrierte:

1100 ccm 0,001 n 2,6-Dichlorphenolindophenol
132 ccm 0,001 n Prune kalt
440 ccm 0,001 n Prune heiß.

Wäre auch nur ein geringer Prozentsatz C-Vitamin vorhanden, so hätte bei der kalten Prunetitration ein meßbarer Wert gefunden werden müssen. Daß bei dem dritten Versuch mit dem Filtrat der Bleifällung auch mit Prune kalt ein Titrationswert ermittelt werden konnte, beweist, daß es sich hierbei nicht um die selben Stoffe handelt, wie bei der normalen Heuhydrolyse.

Bis jetzt war aber noch nicht geklärt, woher die enorm hohen Werte kommen, die Stammler (10) in seinen Heuauszügen fand. Man konnte annehmen, daß das Heu in diesem Falle eine Zersetzung etwa durch Mikroorganismen durchgemacht hatte, wobei die hydrolysierbaren Produkte stark vermehrt wurden. Wahrscheinlicher wird das schon, wenn man die Färbungen der Heuextrakte Stammlers mit den hier erhaltenen vergleicht. Jene sollen so stark dunkel braungrün gefärbt gewesen sein, daß die Nitrobenzolmethode zur Titration angewendet werden mußte, Die im Laufe dieser Arbeit erhaltenen Heuextrakte hatten dagegen eine so helle grünbräunliche Farbe, daß bequem die normale Titrationsmethode Verwendung finden konnte. Trotzdem wurde zur Kontrolle jedesmal auch mit Nitrobenzol titriert.

In einem Versuch konnte dann auch noch bewiesen werden, daß durch die Tätigkeit von Mikroorganismen die hydrolysierbaren Ausgangsstoffe für die Bildung des Reduktionsvermögens der Kochauszüge stark vermehrt wurden.

Hierzu wurde Heu feucht bei ungefähr 35° aufbewahrt. Nach 8 Tagen reduzierte der schwefelsaure Auszug mehr als doppelt so viel wie vorher.

V. Verteilung des C-Vitamins in Obst und Gemüse.

Bei der Zubereitung der Kost für den im Anfang dieser Arbeit beschriebenen Tierversuch wurde gefunden, daß die einzelnen Blätter an ein und der selben Grünkohlpflanze oft ganz

verschiedene Reduktionswerte lieferten. In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Werte für einen Grünkohlkopf, der im Monat Februar geerntet worden war, zusammengestellt.

	Titrationswert für 10 g
Aeußerste dunkelgrüne Blätter ohne Hauptrippe	146
Mittelgroße dunkelgrüne Blätter ohne Hauptrippe	180
Kleine hellgrüne Blätter ohne Hauptrippe	200
Gelbe Blätter um den Vegetationspunkt herum	320
Blattstiele und Blattnerven	115

Je näher am Vegetationspunkt die Blätter also standen, desto größer war ihr Gehalt an C-Vitamin. Wichtig ist weiterhin, daß die Blattrippen nur wenig C-Vitamin enthielten. Die Berücksichtigung dieser Verhältnisse ist, wie schon betont wurde, von großer Bedeutung für Tierversuche, bei denen pflanzliches Material mit immer gleichen Dosen von C-Vitamin verfüttert werden soll. Jedoch selbst, wenn man dieser Tatsache Rechnung trägt, so kann in Folge der Verschiedenheit des C-Vitamingehaltes der selben Pflanzen untereinander die Versuchsreihe doch keine verläßlichen Werte liefern. Zuverlässig arbeitet der Tierversuch erst dann, wenn man die einem bestimmten Titrationswerte entsprechenden, von Fall zu Fall sich ändernden Kohlmengen verfüttert, wie das bei dem weiter oben beschriebenen Tierversuch durchgeführt wurde. Nun wurde die Untersuchung auch auf eine Reihe anderer Kohlarten ausgedehnt. Alle in der folgenden Tabelle ausgewerteten Gemüsearten wurden im November geerntet und mit 0,2%iger Essigsäure extrahiert. Der Titrationswert ist jeweils für 10 g angegeben.

	Grünkohl	Wirsing	Weißkohl	Rotkohl
Aeußerste Blätter ohne Hauptrippe	94,6 (103,4)	25,3 (27,5)	36,0 (36,0)	51,7 —
Hauptrippen dieser Blätter	51,6 (55,0)	27,5 (30,3)	28,2 (28,2)	66,0 (66,0)
Halbäußere Blätter ohne Hauptrippe	121,0 (126,4)	40,7 (42,9)	18,0 (18,0)	93,5 —
Hauptrippen davon	92,5 (99,0)	37,4 (38,2)	28,0 (28,0)	83,6 (83,6)
Innere Blätter mit Rippen	126,4 (130,6)	48,4 (54,0)	21,4 (21,4)	80,3 —
Blätter am Vegetationspunkt	132,0 (141,6)	63,8 (66,0)	27,5 (27,5)	88,0 —
Leitbahnen	101,0 (110,0)	81,5 (84,5)	50,5 (50,5)	100,0 (100,0)

Es zeigte sich, daß Grünkohl und Wirsing, wenn sie auch im C-Vitamingehalt sehr verschieden sind, doch etwa dieselbe Verteilung des C-Vitamins wenigstens in den Blättern aufweisen. Von außen nach innen nahm der Reduktionswert stetig zu, sodaß am Vegetationspunkt der höchste Vitamingehalt angetroffen wurde. Beim Grünkohl enthielten die Blattrippen und die Leitbahnen durchweg weniger als die zugehörigen Blattflächen, während im Wirsing die Rippen etwa dieselben Titrationswerte ergaben wie die entsprechenden Blätter. In den oberen Leitbahnen des Stengels haben sich sogar die höchsten Vitaminkonzentrationen vorgefunden. Bei beiden Kohlarten war der Titrationswert im stark sauren Gebiet 10% niedriger als im neutralen.

Interessant ist auch der Vergleich dieses im November geernteten Grünkohls mit dem im Februar untersuchten (s. S. 23). Bei dem Frühjahrskohl fällt vor allem der starke Unterschied zwischen den Titrationswerten der Leitbahnen und denen der Blattspreite auf. Dieser Unterschied ist bei dem im November untersuchten Kohl ja auch immer noch vorhanden, aber doch viel geringer.

Die anderen beiden Kohlarten hatten wieder viele gemeinsame Merkmale. Einmal sind die Titrationswerte im sauren und neutralen Gebiet bei beiden nicht verschieden. Dann finden sich bei ihnen nicht regelmäßig nach dem Innern zu ansteigende Titrationswerte, sondern es machte sich ein Schwanken des C-Vitamingehaltes bemerkbar. Die Höchstkonzentration lag in den Leitbahnen der Stengelspitze vor.

Weiterhin wurde noch die Frage der Verteilung des Vitamins C in Aepfeln und Birnen untersucht. So ist es ja eine im Volk weit verbreitete Ansicht, man müsse die Schalen mitessen, da in ihnen oder dicht unter ihnen für die Ernährung wertvolle Stoffe säßen.

Die Untersuchung hat ganz allgemein bestätigt, daß die Schalen mehr C-Vitamin enthalten als das Fruchtfleisch. Das Verhältnis zwischen Vitamin-C-Gehalt von Schale und Fruchtfleisch schwankt jedoch sehr nach den untersuchten Apfel- oder Birnsorten. Nachstehend einige Beispiele.

	Schale	Fruchtfleisch
Grüner Speiseapfel	4,4	0,75
Goldparmäne	9,7	6,7
Alexander-Lukas-Birne	4,0	2,2

Eine nach Abschluß dieser Arbeit erschienene Veröffentlichung von G. Kraus (5) befaßt sich unter anderem auch mit der Ermittlung der Verteilung des C-Vitamins im Apfel, allerdings aus-

schließlich mit Hilfe des Tierversuches. Untersucht wurde von ihm der Boskopapfel, von dem 3 g Schale oder 10 g Fruchtfleisch genügten, um ein Meerschweinchen vor Skorbut zu schützen. 10 g Kerngehäuse erwiesen sich als unwirksam. Diese Tierversuche bestätigen also das Ergebnis der Titrationswerte von Apfelschale und Fruchtfleisch.

VI. Beiträge zur Bestimmung des C-Vitamins.

Bei frischem Obst und frischem Gemüse wird man, ohne merkbare Fehler zu begehen, das Reduktionsvermögen der Auszüge gleich dem Gehalt an C-Vitamin setzen können. Daß man diese Identität bei Kochauszügen aus getrockneten Lebens- und Genußmitteln pflanzlichen Ursprungs, wie Gewürzen oder Kaffee, Tee und Kakao nicht ohne weiteres annehmen darf, wurde schon von Nink (7) angedeutet und von Effern (11) zum ersten Male am Beispiel der Gewürznelken bewiesen.

1. Der kalte wässrige Auszug.

Außer den schon geschilderten Methoden Beiers (6) hat sich eine im Laufe dieser Arbeit herausgefundene Methode, der kalte wässrige Auszug mit anschließender Kochung unter Stickstoff zum Nachweis einer etwaigen Hydrolyse sehr gut bewährt. Bei Heu (s. S. 21) hat diese Methode zur raschen Aufklärung über die Natur des Reduktionsvermögens beigetragen. Ihre Anwendung wird allgemein bei getrockneten Produkten zu empfehlen sein. Natürlich ist auf genügende Zerkleinerung des zu untersuchenden Materiales zu achten.

Das fein zerkleinerte Material wird hierbei mit Wasser unter Luftausschluß 2—3 Tage stehen gelassen und dann abkoliert. Man stellt zunächst das Reduktionsvermögen der Flüssigkeit fest, kocht einen Anteil unbehandelt, einen zweiten nach Zusatz von 0,2% Essigsäure, einen weiteren nach Zusatz von 1% Salzsäure, alle je 10 Minuten am Rückflußkühler unter Stickstoff, und stellt ihr Reduktionsvermögen fest. War das Ausgangsreduktionsvermögen gering und erfuhr es eine starke Erhöhung durch das Kochen, so ist es unwahrscheinlich, daß das Ausgangsreduktionsvermögen von C-Vitamin herrührt.

2. Versuche mit Kartoffelpreßsaft.

Es war wiederholt die Beobachtung gemacht worden, daß an Luft zerkleinerte Kartoffeln ihr Reduktionsvermögen innerhalb sehr

kurzer Zeit gänzlich verloren. Diese Erscheinung konnte so gedeutet werden, daß ein Enzym das C-Vitamin spontan unwirksam machte. Es wurde nun versucht, darauf eine Trennung des C-Vitamins von anderen bei der Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol störenden Stoffen aufzubauen.

Die rohen Kartoffeln wurden in der Fleischhackmaschine zerkleinert, der Saft abgepreßt und im kräftigen Strom Luft hindurch geleitet. In einem bestimmten Verhältnis wurde er nun zu der auf das günstigste p_H (pH 5,6) gebrachten C-Vitaminlösung zugegeben. Es gelang auch, in den verschiedensten C-Vitamin-haltigen Säften bei gewöhnlicher Temperatur innerhalb sehr kurzer Zeit (höchstens 5 Minuten) das C-Vitamin radikal zu zerstören. Leider wurden aber die störenden reduzierenden Stoffe, wie Tee-Extraktstoffe und Reduktinsäure, fast ebenso schnell durch diese Oxydase unwirksam gemacht.

3. Besprechung der von Harris (12) empfohlenen Methoden.

Im Folgenden soll eine Arbeit von L. Harris (12) behandelt werden, die sich mit der analytischen Erfassung des C-Vitamins beschäftigt.

Nachdem die von Tillmans und Mitarbeitern erstmalig auf C-Vitamin angewandte Methode der Titration mit 2,6-Dichlorphenolindophenol bekannt geworden war, veröffentlicht Harris seine Arbeit, in denen er eine Modifikation des Tillmans'schen Verfahrens vorschlug. Diese Abänderung charakterisiert er selbst folgendermaßen:

1. Er bestimme direkt die tatsächlich vorhandene Ascorbinsäure, während sich Tillmans mit Zahlenwerten für relative Reduktionspotentiale begnüge.

2. Verwende er kalte Auszüge mit 20%iger Trichloressigsäure.

3. Titriere er immer in stark sauerer Lösung von bestimmtem p_H, wodurch viele störende Stoffe ausgeschaltet würden. Die einzigen ihm bekannten, auch dann noch einwirkenden Körper wären Cystein und Adrenalin. Daneben befänden sich allerdings auch noch im Urin und im Sputum reduzierende Stoffe, die störten.

4. lasse er die Analysenlösung zu der Farbstofflösung fließen, weil dadurch der Umschlag besser erkennbar würde.

Zur ersten Behauptung ist zu bemerken, daß von allem Anfang an eine quantitative Bestimmung des C-Vitamin-Gehaltes der Lebensmittel angestrebt, und daß allein zu diesem Zwecke von

Tillmans (1) die Titrationsmethode mit 2,6 Dichlorphenolindophenol geschaffen wurde. Selbstverständlich mußte die Identität des den Farbstoff reduzierenden Körpers mit dem C-Vitamin erst bewiesen werden, was ja inzwischen auch geschehen ist. Daß es unter den getrockneten Lebensmitteln, Gewürzen und Genußmitteln viele gibt, deren Kochauszüge einen C-Vitamin-Gehalt vortäuschen können, wurde in den letzten Arbeiten des Frankfurter Institutes (6,11) und in dieser Arbeit an vielen Beispielen bewiesen.

Zum zweiten Punkte wäre zu sagen, daß die Harris'sche Arbeitsweise in vielen Fällen genau so gute Werte liefert wie die von Tillmans für frische pflanzliche Lebensmittel anfangs befürwortete heiße Extraktion mit ganz verdünnter Schwefelsäure oder jetzt mit 0,2%iger Essigsäure. In solchen Fällen, wo ein hartes Untersuchungsmaterial vorliegt, gebührt letzterer Methode der Vorrang. Es genügt nämlich meist ein- und manchmal auch zweimaliges Kochen, um fast quantitativ das Reduktionsvermögen auszuziehen, während bei der kalten Mazeration mit Trichloressigsäure in diesem Fall wiederholtes Behandeln des Materials nötig wird. Man kann beide Methoden einander als gleichwertig gegenüberstellen, doch wird man für Pflanzenauszüge besser die vom hiesigen Institut empfohlene, für Extrakte von tierischen Organen besser die Harris'sche Methode anwenden.

Die Titration im sauren Gebiet wurde auch von Tillmans und Siebert (4) schon früher angewandt, um in gefärbten Produkten mit Hilfe der Nitrobenzol-Titration den Titrationswert festzustellen. Immerhin ist die Festsetzung eines bestimmten p_H — Harris gibt p_H 2,5 an — für die Ausführung der Titration von großem Vorteil.

Außer den von Harris (12) erwähnten, die titrimetrische Bestimmung des C-Vitamins störenden Stoffen gibt es noch sehr viele andere, die auch in saurer Lösung den Farbstoff entfärben. Hier seien nur die reduzierenden Körper im Heu und Tee, die Reduktinsäure und noch das Redukton erwähnt. Von Interesse ist es auch noch, daß Oxyhydrochinon in saurem Gebiet höhere Werte ergibt, als im neutralen. Man wird deshalb die Titration im blauen Gebiet des Farbstoffes nicht einfach übergehen dürfen, zumal, da man wertvolle Anhaltspunkte erhält, wenn man sowohl die sauren als auch die neutralen Titrationswerte kennt. Im übrigen kann die Titration fast nie allein entscheiden, ob der reduzierende Körper nun wirklich C-Vitamin ist oder nicht, wenn man von frischem Gemüse absieht, wo sich Vitamin-C-Gehalt und Titrationswert decken.

Weiter gab Harris an, mit umgekehrter Titration besser sichtbare Endwerte zu erhalten. Das trifft zu, wenn man nicht lieber die von Siebert (4) ausgearbeitete Nitrobenzolmethode anwenden will, die es gestattet, selbst in tiefdunklen Lösungen, wie Rotkohlsäften, den Titrationswert weit genauer zu bestimmen. Der Endwert ist innerhalb engster Grenzen faßbar.

Bei seiner Beweisführung für die Vorzüge der Titration bei p_H 2,5 führt Harris die unten angegebenen Titrationswerte an, die in vollkommenem Widerspruch zu den von uns bei in der gleichen Weise behandelten Säften bei p_H 5 ermittelten Titrationswerten stehen.

	Angebliche Titrationswerte nach Tillmans	Harris
2 ccm Orangensaft ohne Zusatz	2,1	2,0
2 ccm Orangensaft 2 Std. gelüftet	2,4	1,6
2 ccm Orangensaft, 2 Std. gekocht	1,9	0,7

Trotzdem wurde der Versuch mit Orangensaft nochmals nachgeprüft. Die Werte sind in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben.

	Titrationswerte nach Tillmans	Harris
Orangensaft ohne Zusatz	3,45	3,45
Orangensaft 2 Stunden gelüftet	3,02	3,01
Orangensaft 2 Stunden gekocht	0,12	0,12

Die Werte, die Harris (12) angibt, müssen auf einem Versuchsfehler beruhen.

Ebenso unverständlich ist es, daß Orangensaft beim Stehen an Luft mit Natriumazetat weniger abnehmen soll als wenn man ihn bei seinem eigenen p_H stehen läßt. Ein Versuch ergab, daß im Gegenteil Orangensaft bei eigenem p_H länger unverändert haltbar ist, als bei der Abpufferung mit Natriumazetat.

Die Ergebnisse, die Harris bei gelüftetem (aerated) bzw. bei gekochtem Orangensaft erhielt, konnten nicht bestätigt werden.

Die Einstellung der Farblösung mit einer Ascorbinsäurelösung, die wieder gegen Jodlösung eingestellt werden muß, wie sie Harris anwendet, ist zwar genau, aber viel umständlicher als die Einstellung gegen Mohr'sches Salz (s. S. 2).

Zusammenfassung.

Zunächst wurde die Herstellung der Auszüge, die Bereitung der 2,6 Dichlorphenolindophenol-Lösung, ihre Einstellung und die Ausführung der Titration zusammenhängend dargestellt.

Der Hauptteil der Arbeit beschäftigt sich mit der Aufklärung des Reduktionsvermögens von Grünkohl und Auszügen aus Kaffee, Tee, Kakao sowie aus Heu.

Beim Grünkohl wurde mit Hilfe von biologischen und chemischen Methoden der Beweis erbracht, daß das bei p_H 2,5 ermittelte Reduktionsvermögen dem C-Vitamin-Gehalt entspricht.

Beim Tee konnte ebenso wie beim Kakao bewiesen werden, daß bei weitem die Hauptmenge des Reduktionsvermögens der Extrakte auf Spaltprodukte zurückzuführen ist, die erst beim Kochen bzw. beim Kochen mit verdünnten Säuren entstehen. In Auszügen aus gebranntem Kaffee ist gleichfalls kein C-Vitamin vorhanden.

Ebenso gelang für die Heuauszüge der Nachweis, daß in ähnlicher Weise wie bei Tee und Kakao der reduzierende Körper bei der Gewinnung der Auszüge überhaupt erst entsteht.

Weiterhin wurden Untersuchungen über die Verteilung des C-Vitamins in Kohlarten sowie in Aepfeln und Birnen besprochen. Es wurde festgestellt, daß die viel verbreitete Meinung, man müsse beim Obst die Schale mitessen, gar nicht so unbegründet ist. In den Schalenteilen fand sich tatsächlich die höchste C-Vitaminkonzentration. Bei den Gemüsearten, die untersucht wurden, war der C-Vitamin-Gehalt in der Nähe des Vegetationspunktes meist höher als in den entfernteren Pflanzenteilen.

Zum Schluß wurden einige im Laufe der Arbeit entwickelte Untersuchungsmethoden beschrieben und in der Literatur angegebene Titrationsarten mit 2,6-Dichlorphenolindophenol diskutiert.

Die vorliegende Arbeit wurde im Universitäts-Institut für Nahrungsmittelchemie Frankfurt a. Main auf Anregung des Instituts-Direktors

Herrn Prof. Dr. J. Tillmans †

unternommen und durchgeführt. Ich erlaube mir, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Tillmans, meinem hochverehrten Lehrer, sowie den Herren Dr. R. Strohecker und Dr. R. Vaubel für die jederzeit bereitwilligst erteilten, wertvollen Ratschläge und das rege Interesse, das sie meiner Arbeit entgegenbrachten, meinen herzlichen Dank zu sagen.

Schriftennachweis.

(1) J. **Tillmans:** Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel 1927 **54,** 33. 1930 **60,** 34.
(2) **J. Jackisch:** Inauguraldissertation Frankfurt a. M. 1932.
(3) **v. Hahn:** Z. U. L. 1931, **61,** 555.
(4) **F. Siebert:** Inauguraldissertation Frankfurt a. M. 1931.
(5) **G. Kraus:** Z. U.L. 1934. **68,** 377.
(6) **H. Beier:** Inauguraldissertation Frankfurt a. M. 1935.
(7) **H. Nink:** Inauguraldissertation Frankfurt a. M. 1934.
(8) **Tsujimura:** Sci. Papers Institut physic. a. chem. Resurch Tokyo **10,** 253. **14,** 63.
(9) **H. von Euler:** Liebigs Annalen der Chemie **505,** 73.
(10) **H. Stammler:** Inauguraldissertation Frankfurt a. M. 1933.
(11) **J. Effern:** Inauguraldissertation Frankfurt a. M. 1934.
(12) **L. Harris:** Biochemical Journal **27,** I, 306 und 590.

Lebenslauf.

Ich, Kurt Enßlin, wurde am 4. Juli 1911 zu Eßlingen am Neckar als Sohn des Reichsbahn-Oberrats Robert Enßlin geboren. Ich besuchte nacheinander die Grundschulen in Eßlingen und Sigmaringen, das Gymnasium in Sigmaringen, die Lateinschule in Leutkirch i. Allgäu und das Realgymnasium in Gießen, wo ich im Februar 1929 das Zeugnis der Reife erhielt. Anschließend studierte ich 7 Semester Chemie an den Universitäten Gießen und Frankfurt. Danach legte ich mein zweites chemisches Verbandsexamen an der Frankfurter Universität ab und begann im Dezember 1932 am hiesigen Universitätsinstitut für Nahrungsmittelchemie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Tillmans vorliegende Arbeit.